

Różnicowanie postaci zintegrowanej i episomalnej DNA HPV-16 metodą real-time PCR w wydzielinie szyjki macicy kobiet z rozpoznaną śródnabłonkową neoplazją i rakiem szyjki macicy

Differentiation of an integrated and episomal HPV-16 DNA using real-time PCR in cervical specimens of women diagnosed with intraepithelial lesions and invasive cervical cancer

Szostek Sława¹, Zawilińska Barbara¹, Klimek Małgorzata², Wójcik Kinga³,
Koprynia Małgorzata¹, Kosz-Vnenchak Magdalena^{1,3}

¹ Zakład Wirusologii, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

² Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie, Polska

³ Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Polska

Streszczenie

Zakażenie przetrwałe wysokoonkogennymi typami HPV, a szczególnie HPV-16 jest uważane za ważny etap procesu karcinogenezy szyjki macicy. Integracja wirusowego DNA do genomu gospodarza poprzez destrukcję sekwencji E2 HPV wpływa na wzrost ekspresji wirusowych białek E6 i E7 i ich udział w transformacji nowotworowej szyjki macicy.

Cel pracy: Celem pracy było zastosowanie metody PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) do oceny częstości występowania zintegrowanej i episomalnej postaci HPV-16 oraz określenia liczby kopii wirusowego genomu (viral load) u kobiet ze zmianami śródnabłonkowymi i z inwazyjnym rakiem szyjki macicy.

Materiał i metodyka: Badaniami objęto 84 kobiety zakażone HPV-16, w tym 44 z LSIL, 7 z HSIL oraz 33 z inwazyjnym rakiem szyjki macicy. Materiał do badania stanowiły wymazy z tarczy i kanału części pochwowej szyjki macicy pobrane szczoteczką typu cytobrush. Obecność sekwencji E2 i E6 HPV-16 oraz ludzkiego genu RNasy P wykrywano ilościową metodą RT-PCR. Wirusowe load przedstawiano w postaci liczby kopii genomu wirusa przypadającej na 1000 komórek.

Wyniki: Postać zintegrowaną genomu HPV-16 wykazano u 97% kobiet z rakiem szyjki macicy. W grupie kobiet z LSIL i HSIL dominowała postać mieszana (jednoczesne występowanie zintegrowanej i episomalnej postaci) genomu wirusa (odpowiednio 84% i 57%). Częstość zintegrowanego genomu HPV-16 wzrastała wraz z zaawansowaniem zmian dysplastycznych szyjki macicy ($p < 0,001$). Obserwowano znamienne statystycznie różnice średnich ilości kopii wirusa w grupie kobiet z LSIL i HSIL w porównaniu z rakiem ($p < 0,001$). U kobiet z wykazaną zintegrowaną postacią genomu HPV-16 wykrywano najwyższe wartości liczby kopii wirusa.

Adres do korespondencji:

Sława Szostek
Zakład Wirusologii, Katedra Mikrobiologii, UJ Collegium Medicum
Polska, 31-121 Kraków, ul. Czysła 18, Polska
tel.: 12 634-54-00; fax: 12 423-39-24;
e-mail: sszostek@cm-uj.krakow.pl

Otrzymano: 30.03.2011
Zaakceptowano do druku: 20.05.2011

Wnioski: Analiza ilościowa sekwencji E2 i E6 HPV-16 badaną metodą RT-PCR może być wykorzystana do określenia stopnia integracji wirusowego genomu i ilościowej oceny kopii wirusa w materiale klinicznym. Może również stanowić dodatkowy parametr określający ryzyko postępu transformacji w obrębie szyjki macicy.

Słowa kluczowe: **HPV-16 / LSIL / HSIL / rak szyjki macicy /
integracja genomu HPV / liczba kopii genomu HPV /**

Summary

Persistent high-risk HPV infection, especially HPV-16, is considered to be an important step in the process of cervical carcinogenesis. Integration of viral DNA into the host genome through the destruction of HPV E2 sequences, increases the expression of viral proteins E6 and E7 and their participation in the transformation of cervical cancer.

Objective: The aim of this study was to apply real-time PCR (RT-PCR) to assess the prevalence of integrated and episomal HPV-16 DNA and determine viral DNA load in women with cervical intraepithelial lesions and invasive cervical cancer.

Material and Methods: A total of 84 women infected with HPV-16, including 44 with LSIL, 7 with HSIL and 33 with invasive cervical cancer, participated in the study. Cervical specimens were collected using the cytobrush. The presence of a sequence of E2 and E6 HPV-16 and human gene RNase P was detected by quantitative RT-PCR. The viral load presented as the form of the virus genome copy numbers per 1,000 cells.

Results: The integrated form of HPV-16 genome was found in 97% of women with cervical cancer. In women with LSIL and HSIL mixed form (simultaneous occurrence of an integrated and episomal form) of the viral genome (84% and 57%, respectively) prevailed. The frequency of the integrated HPV-16 DNA increased with progression of dysplastic lesions of the cervix ($p < 0.001$). Statistically significant differences in average number of copies of the virus in women with LSIL and HSIL compared to patients with cancer ($p < 0.001$) were observed. The highest viral load was detected in women demonstrating an integrated HPV-16 DNA.

Conclusions: Quantitative analysis of the sequence of E2 and E6 HPV-16 tested by RT-PCR can be used to determine the degree of integration of the viral genome and quantitative evaluation of viral load in clinical material. It can also serve as an additional parameter defining risk of progression of transformation in the cervix.

Key words: **HPV-16 / LSIL / HSIL / cervical cancer / integration /
viral load /**

Wstęp

Neoplazja szyjki macicy jest procesem złożonym i wieloczynnikowym, w którym rolę inicjującą przypisuje się głównie wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV) [1].

Zakażenia typami o wysokim potencjale onkogennym HPV są szeroko rozpowszechnione, szczególnie u młodych kobiet i mają często charakter przejściowy. Przetrwała infekcja wysokoonkogennymi typami HPV, a szczególnie HPV-16 jest uważana za ważny i konieczny etap procesu karcinogenezy szyjki macicy. Warunkiem progresji zmian śródnaślennych szyjki macicy jest ekspresja onkogenów E6 i E7 HPV oraz produkcja znacznych ilości wirusowych białek onkogennych E6/E7.

Wirusowe onkoproteiny mają zdolność wiązania się z komórkowymi produktami genów supresorowych p53 i pRb, co prowadzi do zaburzenia cyklu komórkowego, blokowania procesów apoptozy, a następnie transformacji komórek naślennych [2].

W większości zakażeń wysokoonkogennymi typami HPV wzrost ekspresji sekwencji E6 i E7 występuje po integracji wirusa z genomem komórki gospodarza. W tym procesie następuje przerwanie sekwencji, delecja i/lub inaktywacja, obejmujące najczęściej sekwencje w obrębie otwartej ramki odczytu E2, co wpływa na zahamowanie funkcji tego genu i niekontrolowaną ekspresję wirusowych onkogenów E6 i E7 [2].

W ostatniej dekadzie dyskutowane są wyniki badań dotyczących integracji DNA HPV-16 z genomem gospodarza, w powiązaniu z prawdopodobnym postępowaniem choroby w obrębie szyjki

macicy, szczególnie jeżeli taka integracja następuje we wczesnym etapie, w zmianach przednowotworowych, o małym stopniu nasilenia [3, 4, 5]. Autorzy zastanawiają się również czy różnice w ilości kopii wirusa w badanych materiałach wpływają na ryzyko nasilenia zmian śródnaślennych szyjki macicy [6, 7, 8, 9].

Cel pracy

Celem pracy była próba zastosowania ilościowej metody PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) do oceny częstości występowania zintegrowanej i episomalnej postaci HPV-16.

Zastosowana metoda RT-PCR pozwoliła także na oszacowanie liczby kopii wirusowego genomu (*viral load*) i określenie zależności pomiędzy stopniem zaawansowania zmian śródnaślennych i inwazyjnym rakiem szyjki macicy.

Materiał i metoda

Badaniami objęto 84 kobiety w wieku 18-71 lat (średnia wiek 41 ± 15) z regionu południowej Polski, u których wykazano zakażenie HPV-16. Wśród badanej grupy kobiet u 44 rozpoznano badaniem cytologicznym LSIL, u 7 z HSIL oraz u 33 potwierdzono histopatologicznie inwazyjny rak szyjki macicy w stopniu zaawansowania od II do III (wg FIGO).

Kryteria rozpoznania cytologicznego oparto na systemie Bethesda. Materiał do badania stanowiły wymazy z tarczy i kanału części pochwowej szyjki macicy pobrane szczoteczką typu *cytobrush* do jałowej soli fizjologicznej.

Genomowe DNA izolowano przy pomocy zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) wg zaleceń producenta.

Identyfikację HPV-16 przeprowadzono metodą PCR, z zastosowaniem starterów SPF 10 rozpoznających sekwencje zlokalizowane w rejonie L1 HPV. Produkty reakcji amplifikacji genotypowano stosując metodę hybrydizacji na paskach nitrocelulozowych (INNO-LiPA, Innogenetics). Hybrydę uwidaczniano w reakcji enzymatycznej stosując jako koniugat streptawidynę znakowaną alkaliczną fosfatazą. W celu zróżnicowania postaci genomu HPV-16 (episomalna, zintegrowana) przeprowadzono ilościową amplifikację sekwencji E2 i E6 HPV-16 metodą RT-PCR.

W tabeli I przedstawiono sekwencje starterów i sond typu TaqMan użytych do reakcji. Reakcję amplifikacji przeprowadzono według Si i wsp. w 25 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 12,5 µl Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, USA), 100 nM każdego startera, 300 nM sondy TaqMan oraz 2,5 µl izolowanego DNA [10]. Reakcję RT-PCR przeprowadzano w aparacie 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Obejmowała ona etap wstępnej denaturacji w 95°C/20sek., a następnie 45 cykli w temperaturach 95°C/3sek. i 60°C/30sek. Kontrolę pozytywną zintegrowanego genomu HPV-16 stanowiło DNA izolowane z komórek linii SiHa zawierającej insert HPV-16 z delecją genu E2.

Ocenę ilościową można było przeprowadzić po wykreśleniu krzywych standardowych dla genu E2 i E6 HPV-16. W tym celu przygotowano dziesięć rozcieńczeń (każde w trzech powtórzeniach) plazmidu pBR322-HPV-16 (ATCC 45113). Seria zawierała 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 , 5×10^9 kopii wirusowych genów E2/E6 i była włączana do każdego eksperymentu.

Postać genomu HPV-16 rozróżniano na podstawie kryteriów ilościowych sekwencji E2 i E6 HPV-16 przyjętych w literaturze i wyrażanych w postaci ilorazu liczby kopii E2 i E6 na 1000 komórek [8, 10, 11]. Postać episomalną rozpoznawano gdy $E2/E6 \geq 1$, postać mieszaną gdy forma episomalna i zintegrowana występowała równocześnie a iloraz mieścił się w zakresie $1 > E2/E6 > 0$, natomiast postać zintegrowaną gdy $E2/E6 = 0$.

W celu oszacowania liczby komórek w badanych materiałach przeprowadzono amplifikację ludzkiego genu RNAzy P metodą RT-PCR przy użyciu zestawu TaqMan RNase P Detection Reagents Kit (Applied Biosystems, USA).

Uzyskane wyniki analizowano stosując testy statystyczne: t-studenta, Kruskal-Wallisa i Fishera (*Fisher's exact test*). Do analizy statystycznej użyto pakietu statystycznego STATA 8.0

Wyniki

Wyniki dotyczące różnicowania postaci genomu HPV-16 w poszczególnych grupach rozpoznań przedstawiono na rycinie 1.

W większości materiałów (97%) uzyskanych od chorych na raka szyjki macicy wykazano stosunek ilościowy E2/E6 równy 0, co wiązało się z brakiem amplifikacji sekwencji E2 i zintegrowaną postacią wirusa. Tylko w jednej próbce stwierdzono episomalny genom HPV-16. W grupie kobiet z LSIL i HSIL dominowała postać mieszaną genomu wirusa (jednoczesne występowanie zintegrowanej i episomalnej postaci), odpowiednio u 84% i 57% badanych kobiet. Częstość występowania postaci zintegrowanej genomu HPV-16 wzrastała statystycznie wraz z zaawansowaniem zmian dysplastycznych szyjki macicy ($p < 0,001$, test Fishera).

Tabela I. Sekwencje starterów i sond typu TaqMan stosowanych w reakcji RT-PCR.

Startery/sondy	Sekwencja 5' — 3'
E2 HPV-16	
Sonda I	(VIC)-CAC CCC GCC GCG ACC CAT A – (TAMRA)
Starter 1	AAC GAA GTA TCC TCT CCT GAA ATT ATT AG
Starter 2	CCA AGG CGA CGG CTT TG
E6 HPV-16	
Sonda II	(6-FAM)- CAG GAG CGA CCC AGA AAG TTA CCA CAG TT- (TAMRA)
Starter 3	GAG AAC TGC AAT GTT TCA GGA CC
Starter 4	TGT ATA GTT GTT TGC AGC TCT GTG C

Postać zintegrowaną genomu HPV-16 obserwowano częściej u starszych kobiet. Wiek pacjentek z potwierdzoną integracją genomu HPV-16 był znacznie wyższy w porównaniu do kobiet z mieszaną i episomalną postacią zakażenia ($p < 0,0001$, test Kruskal-Wallisa).

Na rycinie 2 przedstawiono porównanie wirusowego *load* wykrywanego u kobiet z różnym stopniem zaawansowania zmian w obrębie szyjki macicy. Wirusowe *load* oznaczano na podstawie ilości kopii sekwencji E6 HPV-16 przypadających na 1000 komórek. Analiza statystyczna ilości kopii wirusa na 1000 komórek wykazała istotne różnice pomiędzy grupą z LGSIL i HGSIL ($p = 0,013$), LGSIL i rakiem ($p < 0,001$), jak również kobietami z HSIL i rakiem ($p < 0,001$).

Dyskusja

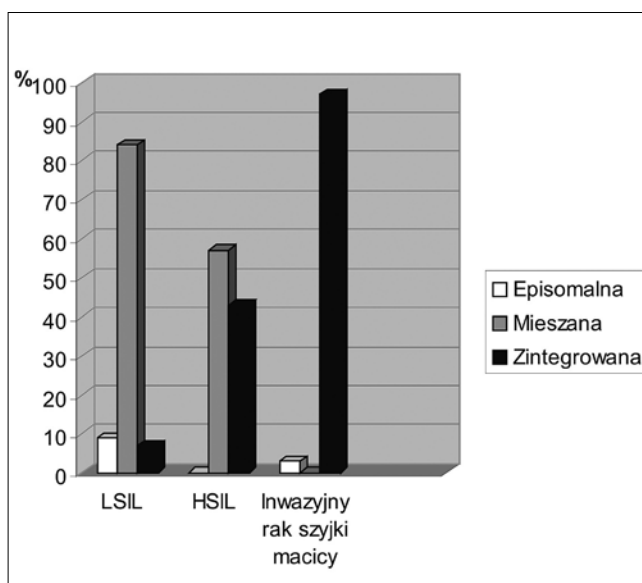
Proces integracji papillomawirusów o wysokim potencjale onkogenym uważany jest za jeden z ważniejszych etapów transformacji nowotworowej szyjki macicy [2]. Wykrywanie zintegrowanego wirusa przeprowadzano do tej pory różnymi metodami m.in. Southern blot, elektroforezą dwukierunkową, nestet PCR, a ostatnio metodą RT-PCR i sekwencjonowaniem [3, 5, 12, 13].

Metoda RT-PCR poprzez możliwość oszacowania ilościowego stosunku między genami E2 i E6 przewyższa stosowane do tej pory metody. Badania niektórych autorów pokazują, że HPV-18 i inne typy o wysokim potencjale onkogenym, w przeciwieństwie do HPV-16 zawsze występują w komórce w postaci zintegrowanej [3, 14].

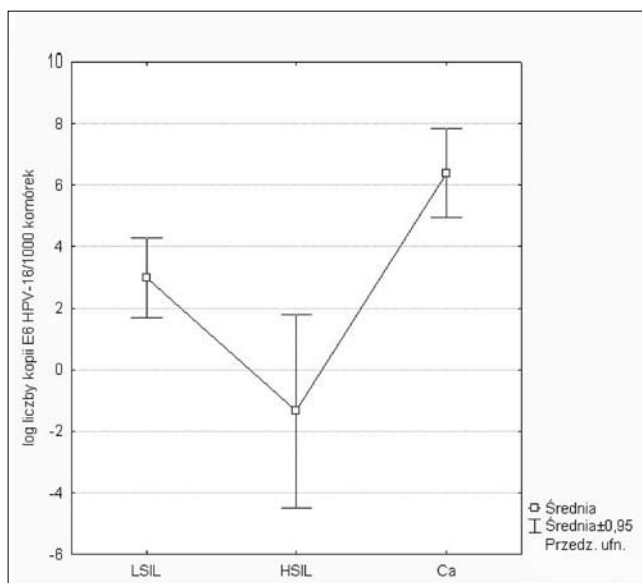
W prezentowanych badaniach postać genomu HPV-16, jak i wirusowy *load* oceniano i analizowano przy pomocy metody RT-PCR. Materiał badany pochodził od kobiet z różnym stopniem zaawansowania zmian śródnaślennych szyjki macicy oraz z inwazyjnym rakiem płaskonabłonkowym. Identyfikację zintegrowanej postaci wirusa oparto na założeniu, że w trakcie procesu integracji następuje uszkodzenie lub delecja sekwencji genu E2 HPV-16, wobec tego ta sekwencja nie jest amplifikowana i stosunek liczbowy kopii E2/E6 wynosi zero. Natomiast episomalna postać wirusowego DNA miałaby zawierać przynajmniej taką samą ilość kopii E2 i E6, co pozwoliło na ustalenie stosunku $E2/E6 \geq 1$. Wartość $E2/E6$ większa od zera a mniejsza od 1 wskazuje więc na obecność obu postaci, zintegrowanej i episomalnej wirusa w badanym materiale (postać mieszana).

Przeprowadzone oznaczenia wykazały obecność wszystkich trzech postaci DNA HPV-16 w badanych materiałach. Zintegrowaną postać wykrywano u 45%, mieszaną u 48% i episomalną u 7% badanych kobiet. Najczęściej wykazywano DNA HPV-16 jako mieszaninę postaci episomalnej i zintegrowanej (48%). Podobne wyniki uzyskali inni autorzy [4, 8, 15].

Niektórzy badacze zwracają uwagę na stosunkowo wysoką częstość mieszanej i zintegrowanej postaci w wymazach uzyskanych od kobiet ze zmianami śródnaślennymi małego stopnia. W naszych badaniach była to ilość 39/44 (88,6%) badanych kobiet, w pracy Huang i wsp. [15] – 5/6 (83,3%), Peisaro i wsp. [11] – 14 z 15 (93,3%) kobiet z CINI/II. Kumala i wsp. wykazali natomiast, że postać mieszana genomu wirusa nie tylko dominowała w LSIL, ale była również wykrywana w wydzielinie szyjki macicy kobiet bezobjawowo zakażonych HPV-16 [8]. Powyższe badania pozwalają na stwierdzenie, że integracja HPV-16 może wystąpić we wczesnym etapie transformacji nowotworowej



Rycina 1. Częstość występowania postaci zintegrowanej, episomalnej i mieszanej DNA HPV-16 na podstawie stosunku ilości kopii sekwencji E2 i E6 HPV-16 w zależności od rozpoznania. Uzyskane wyniki wyrażono w procentach.



Rycina 2. Średnie miano wirusowego *load* HPV-16 w różnym stopniu zaawansowania zmian w obrębie szyjki macicy.

szyjki macicy. Zaburzenie funkcji kontrolnej genu E2 HPV-16 uwalnia ekspresję onkogenów wirusowych, których działanie prowadzi do wzrostu częstości pojawiania się i utrwalania mutacji w sekwencji genomu gospodarza we wczesnych stadiach dysplazji, niestabilności genetycznej i aberracji chromosomowych [15].

W niniejszych badaniach postać episomalną wykazano u 9% kobiet z LSIL i jednej (3%) chorej z inwazyjnym rakiem szyjki macicy. W pracach części autorów postać episomalna wirusa HPV-16 nie była wykrywana w raku szyjki macicy tylko w zmianach przednowotworowych [4, 8].

W pracy Huang i wsp., autorzy badając archiwalne biopsaty zatopione w parafinie wykazali obecność wyłącznie episomalnego DNA HPV-16, od 5,9% do 17,1% w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu wg FIGO [15].

Należy zaznaczyć, że przy ocenie stopnia integracji genomu wirusa na podstawie ilościowej oceny sekwencji genów E2/E6 trzeba także wziąć pod uwagę możliwość uzyskania fałszywych wyników, w przypadkach wystąpienia mutacji w sekwencji E2 HPV lub przerwania genomu wirusa w innym regionie niż E2. Badania kilku autorów potwierdziły istnienie azjatycko-amerykańskiego wariantu DNA HPV-16, z zachowaną sekwencją E1/E2, który był obecny w materiałach klinicznych w postaci episomalnej jak również mieszanej [16, 17]. Autorzy zasugerowali, że w wyżej wymienionych wariantach HPV-16, istnieje alternatywny mechanizm zaburzenia regulacji onkogenów wirusowych E6/E7, nie oparty na delecji sekwencji E2 [16]. W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano, że częstość występowania formy zintegrowanej HPV-16 wzrastała wraz z zaawansowaniem zmian w obrębie szyjki macicy.

Relacje pomiędzy ilością kopii wirusa a stopniem nasilenia zmian w komórkach nabłonka szyjki macicy są ciągle dyskutowane [4, 6, 7, 8, 9, 18, 19, 20]. Część autorów uważa, że wysoki poziom wirusa jest związany z dysplazją dużego stopnia oraz rakiem szyjki macicy, a ryzyko rozwoju raka *in situ* wzrasta 43-krotnie w obecności dużych ilości kopii DNA HPV-16 w komórce [6, 7, 18]. Badania innych autorów wykazały natomiast spadek poziomu wirusowego *load* wraz z zaawansowaniem zmian patologicznych szyjki macicy [19, 20]. Z drugiej strony Kulmala i wsp., podobnie do wyników naszych badań, pokazali wyższy poziom wirusowego *load* u kobiet z LSIL w porównaniu z HSIL i niższy w HSIL niż u chorych na raka [8]. Inne rezultaty badań przedstawiono w pracy Cricca i wsp., gdzie u kobiet z rakiem wykazywano znamienne mniej kopii wirusa w porównaniu z pacjentkami ze śródnabłonkową neoplazją (CIN I, CIN II/III) [4].

Z kolei Monnier-Benoit [9] stwierdzili, że u kobiet z wirusowym *load* HPV-16 powyżej 200 kopii na tysiąc komórek, częstość pojawienia się CIN II/III w ciągu 18. miesięcy jest większa w porównaniu z grupą, u której wykazano liczbę kopii wirusa poniżej 200 kopii na 1000 badanych komórek. Ponadto w pracy Sounier i wsp. autorzy postulują, aby kobiety zakażone HPV-16, u których wykazano poziom wirusowego *load* wyższy niż 22000 kopii na 1000 komórek, uznać za predysponowane do rozwoju zmian śródnabłonkowych dużego stopnia [19].

Reasumując uzyskane w pracy wyniki i przegląd literatury wydaje się, że w sytuacji kiedy 90% zakażeń wysokoonkogenicznymi typami HPV ulega spontanicznej regresji w ciągu kilku miesięcy, a tylko 10% prowadzi do przetrwałego zakażenia szyjki macicy poszukiwanie dodatkowych parametrów pozwalających na identyfikację kobiet najbardziej zagrożonych transformacją nowotworową jest ważne z punktu widzenia klinicznego. Ocena ilościowa kopii wirusa oraz badanie integracji genomu HPV mogą stanowić istotny czynnik prognostyczny.

Wnioski

Wstępne badania sugerują, że różnicowanie postaci zintegrowanej HPV-16 może być wykorzystane jako dodatkowy parametr w przewidywaniu progresji zmian śródnabłonkowych w obrębie szyjki macicy.

Amplifikacja w czasie rzeczywistym sekwencji E2 i E6 HPV-16 może być wykorzystywana zarówno do badań ilościowych wirusowych genów biorących udział w procesie karcinogenezy, jak również do różnicowania postaci episomalnej i zintegrowanej wirusa, co może mieć istotne znaczenie prognostyczne w rozwoju raka szyjki macicy kobiet zakażonych HPV.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy MNiSW nr N401219034.

Praca została zgłoszona na Konferencję pt. „Badania molekularne w położnictwie i ginekologii – możliwy element strategii klinicznej”, która odbyła się dnia 8 kwietnia 2011 r. w Poznaniu

Piśmiennictwo

- Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, [et al.]. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003, 348, 518-527.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2, 342-350.
- Hudelist G, Manavi M, Pischinger K, [et al.]. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*. 2004, 92, 873-880.
- Cricca M, Morselli-Labate A, Venturoli S, [et al.]. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol*. 2007, 106, 549-557.
- Gallo G, Bibbo M, Bagella L, [et al.]. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol*. 2003, 56, 532-536.
- Sun C, Liu J, Wu D, [et al.]. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002, 76, 41-47.
- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson A, [et al.]. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *Lancet*. 2000, 355, 2194-2198.
- Kulmala S, Syrjänen S, Gyllenstein U, [et al.]. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol*. 2006, 59, 513-517.
- Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, [et al.]. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol*. 2006, 35, 270-277.
- Si H, Tsao S, Poon C, [et al.]. Physical status of HPV-16 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Virol*. 2005, 32, 19-23.
- Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol*. 2002, 40, 886-891.
- Łukaszuk K, Liss J, Emerich J, Wójcikowski C. Zastosowanie ilościowej oceny kopi genów E2/E6 HPV 16 jako markera diagnostycznego raka szyjki macicy. *Ginekol Pol*. 2003, 74, 793-798.
- Matovina M, Sabol I, Grubišić G, [et al.]. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol*. 2009, 113, 120-127.
- Pirami L, Giachè V, Becciolini A. Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol*. 1997, 50, 600-604.
- Huang L, Chao S, Lee B. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2008, 61, 627-631.
- Casas L, Galvan S, Ordoñez R, [et al.]. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 1999, 83, 449-455.
- Azizi N, Brazete J, Hankins C, [et al.]. Influence of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E2 polymorphism on quantification of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol*. 2008, 89, 1716-1728.
- Carcopino X, Henry M, Benmouira D, [et al.]. Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J Med Virol*. 2006, 78, 1131-1140.
- Saurier M, Monnier-Benoit S, Maury F, [et al.]. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol*. 2008, 46, 3678-3685.
- Yoshida T, Sano T, Kanuma T, [et al.]. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2008, 18, 121-127.